



## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 <sup>4</sup> <b>A61K 9/10</b>	<b>A1</b>	(11) 国際公開番号 <b>WO 89/ 06532</b>  (43) 国際公開日 1989年7月27日 (27.07.89)
(21) 国際出願番号 PCT/JP89/00022 (22) 国際出願日 1989年1月11日 (11. 01. 89) (31) 優先権主張番号 特願昭63-5361 (32) 優先日 1988年1月13日 (13. 01. 88) (33) 優先権主張国 JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 大日本製薬株式会社 (DAINIPPON PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP] 〒541 大阪府大阪市東区道修町3丁目2番地 Osaka, (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 安井清忠 (YASUI, Kiyotada) [JP/JP] 〒581 大阪府八尾市北本町2丁目14番24号 Osaka, (JP) 東 敏郎 (HIGASHI, Toshiro) [JP/JP] 〒655 兵庫県神戸市垂水区塩屋北町3丁目7番11号 Hyogo, (JP) 今里 雄 (IMASATO, Yuu) [JP/JP] 〒565 大阪府豊中市新千里東町2丁目5番A3-202 Osaka, (JP) (74) 代理人 弁理士 小田島 平吉, 外 (ODAJIMA, Heikichi et al.) 〒107 東京都港区赤坂1丁目9番15号 日本自転車会館 小田島特許事務所 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AT (欧州特許), BE (欧州特許), CH (欧州特許), DE (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), IT (欧州特許), JP, KR, LU (欧州特許), NL (欧州特許), SE (欧州特許), US. 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: OOZING-PROOF LIPOSOME PREPARATION (54) 発明の名称 漏出防止リポソーム製剤  (57) Abstract  A frozen or lyophilized liposome preparation containing a water-soluble high-molecular substance as the active ingredient, which contains gelatin, albumin or polyethylene glycol in the inner aqueous phase of liposome. This preparation does not cause oozing of the high-molecular substance upon freezing or lyophilization, thus being quite useful as a liposome preparation of such a substance.		

## (57) 要約

リボソームの内水相にゼラチン，アルブミン若しくはポリエチレングリコールを含むことを特徴とする水溶性高分子物質を有効成分とする凍結又は凍結乾燥リボソーム製剤。本発明の製剤は、凍結又は凍結乾燥による水溶性高分子物質の漏出が防止できるので、該物質のリボソーム製剤としてきわめて有用である。

### 情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストリア	FR	フランス	MR	モーリタニア
AU	オーストラリア	GA	ガボン	MW	マラウイ
BB	バルバドス	GB	イギリス	NL	オランダ
BE	ベルギー	HU	ハンガリー	NO	ノルウェー
BG	ブルガリア	IT	イタリア	RO	ルーマニア
BJ	ベナン	JP	日本	SD	スーダン
BR	ブラジル	KP	朝鮮民主主義人民共和国	SE	スウェーデン
CF	中央アフリカ共和国	KR	大韓民国	SN	セネガル
CG	コンゴ	LI	リヒテンシュタイン	SU	ソビエト連邦
CH	スイス	LK	スリランカ	TD	チャード
CM	カメルーン	LU	ルクセンブルグ	TG	トーゴ
DE	西ドイツ	MC	モナコ	US	米国
DK	デンマーク	MG	マダガスカル		
FI	フィンランド	ML	マリ		

## 漏 出 防 止 リ ボ ソ ー ム 製 剤

技 術 分 野

本発明は、凍結後又は凍結乾燥後の有効成分漏出を防止したリボソーム製剤に関し、更に詳細には、リボソームの内水相にゼラチン、アルブミン若しくはポリエチレングリコールを含むことを特徴とする水溶性高分子物質を有効成分とする凍結用又は凍結乾燥用リボソーム製剤（以下「本発明の製剤」という）に関する。

リボソームには水性物質により相互に一定の間隔を保たれた多数のリン脂質二重層からなる玉葱様多薄層構造を有するもの（以下「多重層リボソーム」という）と、水性物質を含む単一のリン脂質二重層を有するもの（以下「一枚層リボソーム」という）がある。

本明細書においては、多重層リボソームの一番外側にあるリン脂質二重層の外側又は一枚層リボソームのリン脂質二重層の外側を「外水相」と、多重層リボソーム中にある各リン脂質二重層間又は一枚層リボソームのリン脂質二重層の内側を「内水相」と呼ぶことにする。

リボソームは、水溶性物質なら何でも包含できること、マクロファージにより貪食作用を受けやすく肝臓、脾臓、

骨髓等の細網内皮系に取り込まれやすいこと等から、生体内へ主薬を効率的に移行させる薬物療法の一手段として活発な研究が行われている。

リボソーム自身は冷蔵保存でも安定であるが、リボソームに包含された水溶性物質の中には冷蔵保存でも溶液中では不安定なものが多く、これらについては凍結又は凍結乾燥保存することが不可欠である。ところが、リボソームは凍結又は凍結乾燥により、内水相に包含させた水溶性物質が漏出することが知られており、この製剤の実用性を制限する一因となっている。

#### 背景技術

従来、漏出を防止する手段としては、外水相にジメチルスルホキシド、グリセロール、アラニン、グリシンベタイン ( J. Pharm. Pharmacol. 38, 259 ~ 263 (1986) )、多糖類、ポリビニルピロリドン、マンニトール ( Int. J. Pharm. 22, 299 ~ 310 (1984) )、デキストラン、アラビアゴム、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、雄牛アルブミン、蔗糖 (特公昭61-21449) を用いている例及び内外両水相にトレハロース、マルトース、ラクトース、スクロース、グルコース、デキストラン等の糖を用いている例 (特表昭62-500102) 等が報告されているが、いずれも漏出防止の効果が不十分である。

#### 発明の開示

本発明者等は、リボソームの内水相にゼラチン、アルブミン又はポリエチレングリコールを含有させることにより、凍結又は凍結乾燥による水溶性高分子物質の漏出を十分に防止できることを見出し、本発明を完成した。

本発明の製剤のリボソームに内包される有効成分である水溶性高分子物質としては、癌壊死因子 (tumor necrosis factor; 以下「TNF」と略す)、インターロイキン1 (以下「IL-1」と略す)、インターフェロン、インスリン、ウロキナーゼ、プロウロキナーゼ、ヘモグロビン、スーパーオキシドディスムターゼ、ソマトスタチン、ヘパリン等が挙げられる。

これは単独又は他の成分との組み合わせであってもよく、或いは公知の安定化剤を加えてもよい。

リボソームには前述のように、多重層リボソームと一枚層リボソームがあるが、本発明の製剤にはいずれのタイプのものも使用することができる。

膜強化剤としてコレステロール、荷電物質としてホスファチジン酸、ジセチルホスフェート、ステアリルアミン等を加えたものを用いてもよい。

本発明の製剤の製造概略の一例を以下に説明する。

親油性物質を有機溶媒に溶解し、窒素気流下又は真空下にロータリーエバポレーターで溶媒を除去し、脂質残渣を容器の壁上にフィルム化する。そこへ、有効成分である水溶

性高分子物質及びゼラチン、アルブミン又はポリエチレングリコールを溶解した水溶液を添加し、攪拌又は超音波処理によりリボソーム分散液を得る。これを孔径の減少するフィルターで順次濾過したりポリカーボネートのフィルターを用いて高圧で濾過したり、高圧乳化機（マントンゴーリン乳化機）を用いることにより粒子径を揃えてもよい。得られたリボソーム分散液を遠心分離、限外濾過、透析、ゲル濾過等に付し、リボソームに取り込まれなかった物質を分離除去し、凍結を行うか又はマンニトール、蔗糖等の糖類やグリシン等のアミノ酸類を添加して凍結乾燥を行う。凍結の場合、外水相に公知の保護物質を加える方が好ましい。

以上のようにして製造した本発明の製剤は、凍結させたものは使用時に融解して、凍結乾燥させたものは使用時にそのまま又は適当な水性溶媒を加えることにより、注射剤、経口剤、外用剤等として用いることができる。

#### 図面の簡単な説明

図1は凍結融解後のヒトTNF 包含率に対する、外水相に加えたトレハロース濃度の影響を示しており、図2は外水相に加えたゼラチン濃度の影響を示している。いずれも黒丸印が本発明のリボソーム製剤であり、白丸印が対照リボソーム製剤である。

発明を実施するための最良の形態

以下に実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例 1

- ① 卵黄ホスファチジルコリン 1g をクロロホルム 10ml に溶解し、ロータリーエバポレーターでクロロホルムを除去した後、特開昭 60-232097 実施例 3 で調製したヒト TNF (以下、単に「ヒト TNF」という) 2,400 万 JRU 及びゼラチン (分子量約 10 万) 80mg を加えた 50mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) を加えガラスビーズを入れて攪拌し、脂質を分散させた後、0.8  $\mu$ m, 0.65  $\mu$ m, 0.45  $\mu$ m, 0.3  $\mu$ m, 0.22  $\mu$ m のメンブレンフィルターで逐次濾過し粒子径を整えた後、セファロース 4B のカラムを用いてゲル濾過 (溶離液: 50 mM リン酸緩衝液 pH 7.0) し、外水相の薬物及びゼラチンを除去した。
- ② ゼラチンを加えないこと以外は①と同様にしてリボソーム懸濁液を調製した。
- ③ 上記①、②のリボソーム懸濁液にトレハロース又はゼラチンを図 1 及び図 2 に示した量加え -70℃ の冷凍庫に 1 時間保存して凍結させ、室温で融解させた後、競合法による酵素免疫測定 (以下「EIA」という) で外水相中のヒト TNF 量を測定し、一方全ヒト TNF 量はトリトン X100 でリボソームを可溶化した後測定し、包含率を求めた。

結果を図 1 及び図 2 に示す。

図 1, 図 2 に示したようにヒト TNF とゼラチンが内水相に共存する本発明のリボソームは、ゼラチンを内水相に含まないリボソームよりも明らかにヒト TNF の包含率が高いことがわかる。また図 1 からわかるように、外水相へのトレハロースの添加は更に包含率を改善する効果が認められた。

一方、図 2 に示したようにゼラチンの外水相への添加は、本発明のリボソームでは包含率を低下させ、ゼラチンを内水相に含まないリボソームにおいても、外水相ゼラチンの実用濃度 (0~3mg/ml) では包含率を低下させており、従来知られているグリセロールや糖類等のリボソーム保護物質とは異なる性質を示した。

#### 実施例 1 の 2

実施例 1 ① で作製したゼラチン内包リボソーム懸濁液を 4℃ で 24 時間保存した試料と 40℃ の恒温槽中で 10 分間保存して内水相のゼラチンをゲル化した試料を -70℃ の冷凍庫に 1 時間保存して凍結させ、室温で融解させた後、競合法による EIA によりヒト TNF の包含率を測定した。前者の包含率は 67.9% であり、後者の包含率は 69.0% であり、内水相のゼラチンがゾル化していてもゲル化していても同じ保護効果を示した。

#### 実施例 2



① 卵黄ホスファチジルコリン 700mg, コレステロール 200mg, ステアリルアミン 100mg をそれぞれクロロホルムに溶解して混和し、溶媒を除去した後、ヒトTNF2,400万JRU 及びゼラチン (分子量約7000)80mg を添加して攪拌しメンブレンフィルターで濾過した後、表1又は表2に示した水溶液をリボソーム懸濁液に対して1:1の割合で加えて凍結融解又は凍結乾燥再溶解した。凍結乾燥は予備凍結 $-50^{\circ}\text{C}$ , 一次乾燥 $-20^{\circ}\text{C}$ , 二次乾燥 $20^{\circ}\text{C}$  真空度0.1torr. 以下の条件で行った。再溶解は50mMリン酸緩衝液, pH7.0を用いて行った。

② ゼラチンを加えないこと以外は①と同様にして対照リボソームを得た。

③ 上記①, ②のリボソームについて、競合法によるEIAを用いてヒトTNFの包含率を測定した。表1及び表2に示したようにゼラチンを含まないリボソームに比べ、ゼラチンを内包するリボソームは、明らかに凍結融解及び凍結乾燥再溶解後のヒトTNFの包含率が高いことがわかった。

(以下余白)

表 1 凍結乾燥再溶解後のリボソームからのヒトTNF 漏  
出に及ぼすゼラチンと各種糖の影響

リボソームの 種類 外水相 への添加物	0.8% ゼラチン を内包する リボソーム	対 照 リボソーム
20% トレハロース	98.4	55.5
20% 蔗糖	96.4	66.4
10% 乳糖	90.1	56.3

(以下 余 白)

表 2 凍結融解後のリボソームからのヒトTNF 漏出に及  
ぼすゼラチンと各種糖の影響

外水相 への添加物	リボソームの 種類	0.8% ゼラチン を内包する リボソーム	対照 リボソーム
buffer		80.4	73.8
20% トレハロース		> 97.6	90.6
10% 乳糖		92.7	71.9
20% 蔗糖		> 97.6	89.2
10% 果糖		96.4	82.2
10% ブドウ糖		97.5	83.8
10% マンニトール		> 97.6	87.3

(以下余白)

実施例 3

①卵黄ホスファチジルコリン900mg,ジパルミトイルホスファチジン酸ナトリウム100mgをクロロホルム10mlに溶解し、ロータリーエバポレーターでクロロホルムを除去した後、ヒトTNF2,400万JRU及びゼラチン(分子量約7000)200mgを加えた50mMリン酸緩衝液(pH 7.0)を加えガラスビーズを入れて攪拌し、脂質を分散させた後、0.2  $\mu$ mのポリカーボネートメンブレンフィルターで高圧濾過し、粒子径を整えた後、セファロース4Bのカラムを用いてゲル濾過(溶離液;50mMリン酸緩衝液pH7.0)し、外水相の薬物及びゼラチンを除去し、リボソーム懸濁液を調製した。このリボソーム懸濁液に40%蔗糖水溶液をリボソーム懸濁液に対して1:1の割合で加え-70℃の冷凍庫に1時間保存後、室温で融解させた。

②ゼラチンを加えないこと以外は①と同様にして対照リボソームを得た。

③上記①, ②のリボソームについて、競合法によるEIAを用いて外水相中のヒトTNF量を測定し、一方全ヒトTNF量はトリトンX100でリボソームを可溶化した後測定し、包含率を求めた。

表3に示したようにヒトTNFとゼラチンが内水相に共存するリボソームは、ゼラチンを内包しないリボソームよりも明らかにヒトTNFの包含率が高く、また外水相への蔗糖

の添加は更に包含率を改善する効果が認められた。

表 3 凍結融解後におけるリボソームのヒトTNF 保持率

外水相 への添加物	リボソームの 種類	2%ゼラチン を内包する リボソーム	対 照 リボソーム
buffer		69.5	13.2
40% 蔗糖		96.0	69.9

#### 実施例 4

ゼラチン200mg の代わりに牛血清アルブミン200mg を用いる他は、実施例3と同様にしてリボソーム製剤を調製し、包含率を求めた。

表4に示したようにヒトTNF とアルブミンが内水相に共存するリボソームは、アルブミンを内包しないリボソームよりも明らかにヒトTNF の包含率が高く、また外水相への蔗糖の添加は更に包含率を改善する効果が認められた。

表 4 凍結融解後におけるリボソームのヒトTNF 保持率

外水相 への添加物	リボソームの 種類	2% アルブミン を内包する リボソーム	対 照 リボソーム
buffer		71.9	13.2
40% 蔗糖		97.7	69.9

#### 実施例 5

ゼラチン 200mg の代わりにポリエチレングリコール（分子量約 20,000）200mg を用いる他は、実施例 3 と同様にしてリボソーム製剤を調製し、凍結融解を行った。また、実施例 2 と同様の条件によって凍結乾燥を行った。実施例 3 と同様にして包含率を求めた。表 5 及び表 6 に示したようにポリエチレングリコールを含まないリボソームに比べ、ポリエチレングリコールを内包するリボソームは、凍結融解及び凍結乾燥再溶解後のヒト TNF の包含率が明らかに高いことがわかった。

表 5 凍結融解後におけるリボソームのヒトTNF 保持率

外水相 への添加物	リボソームの 種類	2%ポリエチレングリ コール 内包 リボソーム	対 照 リボソーム
buffer		62.7	13.2
40% 蔗糖		92.6	69.9

表 6 凍結乾燥再溶解後におけるリボソームの  
ヒトTNF 保持率

外水相 への添加物	リボソームの 種類	2%ポリエチレングリ コール 内包 リボソーム	対 照 リボソーム
40% 蔗糖		73.2	38.1

実施例 6

卵黄ホスファチジルコリン700mg, コレステロール200mg, ステアリルアミン100mg をそれぞれクロロホルムに溶解して混和し、溶媒を除去した後、特開昭61-27122実施例2で調製したヒトIL-1(以下、単に「ヒトIL-1」という)8.4mg 及びゼラチン(分子量約7000)80mg を添加して攪拌しメンブレンフィルターで濾過した後、表7及び表8に示した糖を所定量加えて凍結融解又は凍結乾燥再溶解した。凍結乾燥は予備凍結 $-50^{\circ}\text{C}$  , 一次乾燥 $-20^{\circ}\text{C}$  , 二次乾燥 $20^{\circ}\text{C}$  , 真空度0.1torr.以下の条件で行った。再溶解は50mMリン酸緩衝液, pH7.0を用いて行った。ヒトIL-1の定量は競合法によるEIAにより行い、包含率は実施例1と同様にして求めた。

表7及び表8に示したように、ゼラチンを内包するリボソームは、凍結融解及び凍結乾燥再溶解後のヒトIL-1の包含率が95%以上であることがわかった。

(以下 余 白)



表 7 凍結融解後におけるリボソームのヒトIL-1保持率

外水相 への添加物	リボソーム	0.8% ゼラチン を内包する リボソーム
	20% トレハロース 10% 乳糖 20% 蔗糖	> 95.0 > 95.0 > 95.0

表 8 凍結乾燥再溶解後におけるリボソームのヒトIL-1  
保持率

外水相 への添加物	リボソーム	0.8% ゼラチン を内包する リボソーム
	20% トレハロース 10% 乳糖 20% 蔗糖	> 95.0 > 95.0 > 95.0

実施例 7

① 卵黄ホスファチジルコリン 700mg, コレステロール 200mg, デシルアミン 100mg をそれぞれクロホルムに溶解して混和し、溶媒を除去した。ヒト TNF 2,400 万 JRU を 5mM リン酸緩衝液含有 0.9% 食塩水 1 ml に溶解した溶液 (以下「TNF 単独」という) 10ml 及びゼラチン (分子量約 7000) 80mg をこれに添加して攪拌し、メンブレンフィルターで濾過した後、40% 蔗糖水溶液をリボソーム懸濁液に対して 1:1 の割合で加え、予備凍結  $-50^{\circ}\text{C}$ , 一次乾燥  $-20^{\circ}\text{C}$ , 二次乾燥  $20^{\circ}\text{C}$ , 真空度 0.1 torr. 以下の条件で凍結乾燥を行った。50mM リン酸緩衝液, pH 7.0 を用いてこれを再溶解した。

② ① のリボソーム製剤又はヒト TNF 単独を 300,000 JRU/匹となるように健康な ddY 系雄性マウスに静脈注射し、翌日の生存率を調べた。ヒト TNF 単独では、全数が死亡したのに対し、ヒト TNF リボソーム製剤では全数が生存していた。

実施例 8

BALB/c 系雌性マウス (8 週令) に Meth A sarcoma 細胞 ( $2 \times 10^5$ ) を皮内移植した。7 日目に実施例 7 ① で作製したヒト TNF リボソーム製剤 3,000 JRU/匹を腫瘍内に 1 回投与した後、移植 24 日目の治癒の程度を見たところ、全数のマウスが完治していた。尚、腫瘍重量が 1% 以下にな

ったものを完治と判断した。

実施例 7 及び 8 から、本発明のヒト TNF リボソーム製剤はヒト TNF 単独に比べて毒性の低減が見られ、しかも TNF 本来の治癒効果をも有していることがわかる。

#### 産業上の利用可能性

本発明の製剤は、凍結又は凍結乾燥による水溶性高分子物質の漏出が防止できるので、該物質のリボソーム製剤としてきわめて有用である。

(以下 余 白)

請求の範囲  
18

1. リボソームの内水相にゼラチン、アルブミン若しくはポリエチレングリコールを含むことを特徴とする水溶性高分子物質を有効成分とする凍結又は凍結乾燥リボソーム製剤。

2. 外水相に糖又はアミノ酸を含む特許請求の範囲第1項記載の凍結リボソーム製剤。

3. 水溶性高分子物質が蛋白である特許請求の範囲第1項記載のリボソーム製剤。

4. 蛋白がヒト癌壊死因子又はインターロイキン1である特許請求の範囲第1項記載のリボソーム製剤。

図1

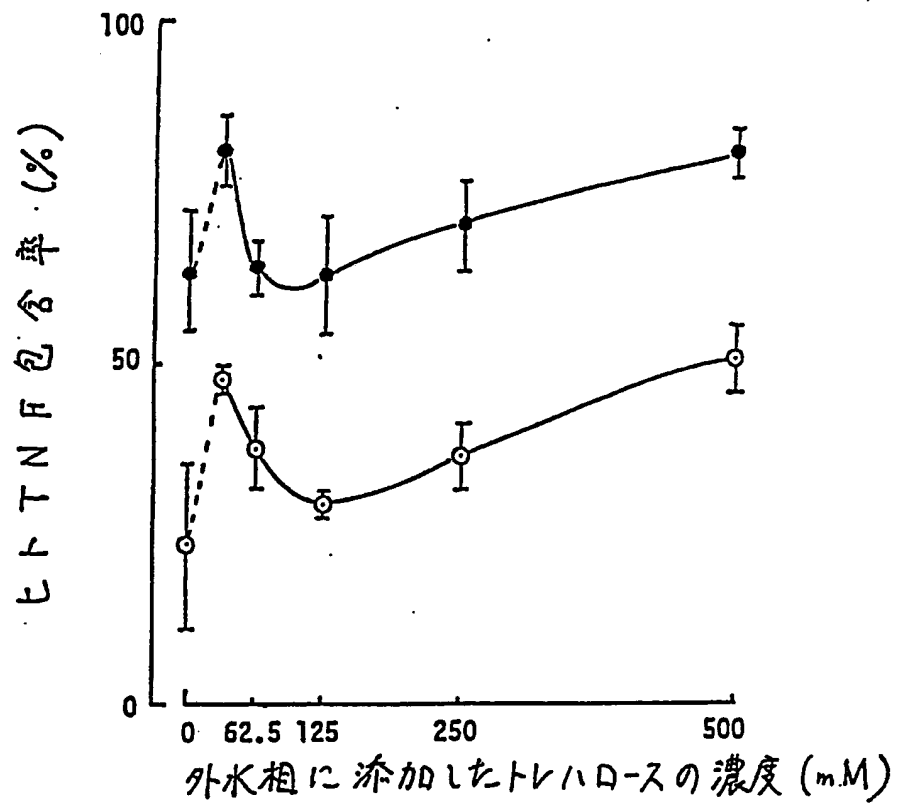
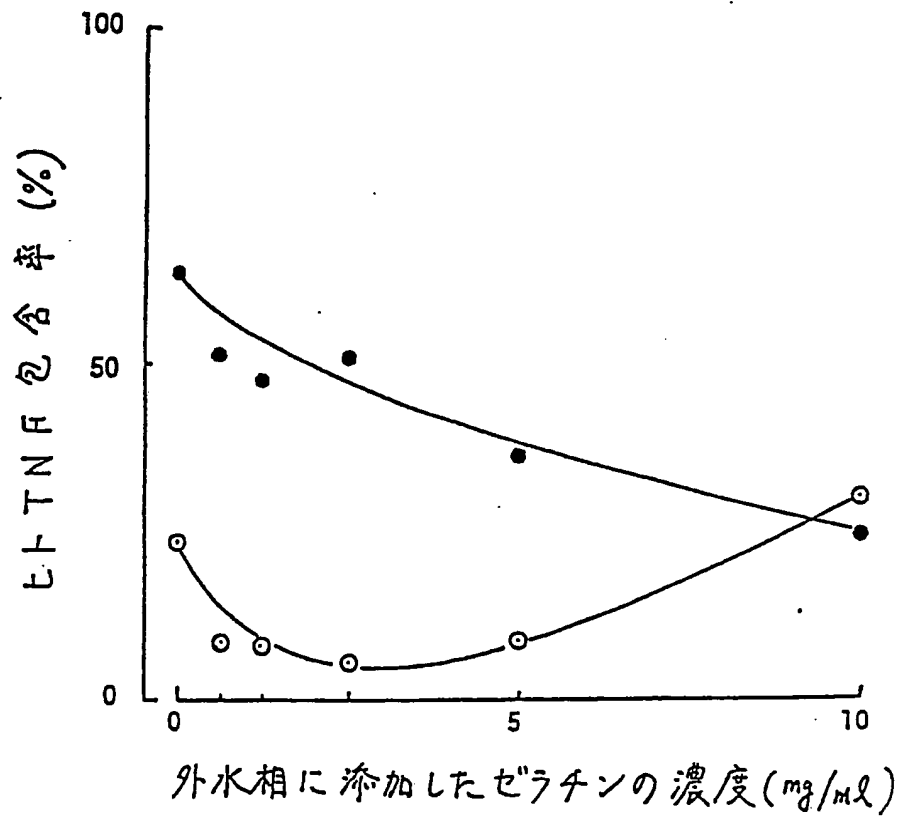


図2



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP89/00022

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (If several classification symbols apply, indicate all) <sup>6</sup> According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">           Int.Cl<sup>4</sup>      A61K9/10         </div>																	
<b>II. FIELDS SEARCHED</b> <div style="text-align: center; margin-top: 5px;">Minimum Documentation Searched <sup>7</sup></div> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 25%; padding: 5px;">Classification System</td> <td style="padding: 5px;">Classification Symbols</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 10px;">IPC</td> <td style="padding: 10px;">A61K9/10, A61K37/00-37/04</td> </tr> </table> <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched <sup>8</sup></div>			Classification System	Classification Symbols	IPC	A61K9/10, A61K37/00-37/04											
Classification System	Classification Symbols																
IPC	A61K9/10, A61K37/00-37/04																
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <sup>9</sup></b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 10%; padding: 5px;">Category <sup>9</sup></th> <th style="width: 70%; padding: 5px;">Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup></th> <th style="width: 20%; padding: 5px;">Relevant to Claim No. <sup>13</sup></th> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 10px;">Y</td> <td style="padding: 10px;">JP, B2, 61-21449 (Battelle Memorial Institute) 27 May 1986 (27. 05. 86) Claim 4 &amp; DE, A, 2,834,308 &amp; FR, A, 2,399,241 &amp; US, A, 4,229,360</td> <td style="text-align: center; padding: 10px;">1-4</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 10px;">Y</td> <td style="padding: 10px;">JP, A, 58-174330 (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.) 13 October 1983 (13. 10. 83) Claim &amp; EP, A, 91,258 &amp; FR, A, 2,530,472 &amp; DE, A, 3,373,628 &amp; US, A, 4,447,355</td> <td style="text-align: center; padding: 10px;">1-4</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 10px;">Y</td> <td style="padding: 10px;">EP, A2, 251,001 (Biotest Wolfram G.m.b.H.) 07 January 1988 (07. 01. 88) Claim 1</td> <td style="text-align: center; padding: 10px;">1-4</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 10px;">E</td> <td style="padding: 10px;">JP, A, 64-9931 (Daiichi Seiyaku Co., Ltd.) 13 January 1989 (13. 01. 89) Pages 1 to 6 (Family: none)</td> <td style="text-align: center; padding: 10px;">1-4</td> </tr> </table>			Category <sup>9</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>	Y	JP, B2, 61-21449 (Battelle Memorial Institute) 27 May 1986 (27. 05. 86) Claim 4 & DE, A, 2,834,308 & FR, A, 2,399,241 & US, A, 4,229,360	1-4	Y	JP, A, 58-174330 (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.) 13 October 1983 (13. 10. 83) Claim & EP, A, 91,258 & FR, A, 2,530,472 & DE, A, 3,373,628 & US, A, 4,447,355	1-4	Y	EP, A2, 251,001 (Biotest Wolfram G.m.b.H.) 07 January 1988 (07. 01. 88) Claim 1	1-4	E	JP, A, 64-9931 (Daiichi Seiyaku Co., Ltd.) 13 January 1989 (13. 01. 89) Pages 1 to 6 (Family: none)	1-4
Category <sup>9</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>															
Y	JP, B2, 61-21449 (Battelle Memorial Institute) 27 May 1986 (27. 05. 86) Claim 4 & DE, A, 2,834,308 & FR, A, 2,399,241 & US, A, 4,229,360	1-4															
Y	JP, A, 58-174330 (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.) 13 October 1983 (13. 10. 83) Claim & EP, A, 91,258 & FR, A, 2,530,472 & DE, A, 3,373,628 & US, A, 4,447,355	1-4															
Y	EP, A2, 251,001 (Biotest Wolfram G.m.b.H.) 07 January 1988 (07. 01. 88) Claim 1	1-4															
E	JP, A, 64-9931 (Daiichi Seiyaku Co., Ltd.) 13 January 1989 (13. 01. 89) Pages 1 to 6 (Family: none)	1-4															
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><sup>*</sup> Special categories of cited documents: <sup>10</sup></p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"G" document member of the same patent family</p> </div> </div>																	
<b>IV. CERTIFICATION</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;">Date of the Actual Completion of the International Search March 24, 1989 (24. 03. 89)</td> <td style="width: 50%; padding: 5px;">Date of Mailing of this International Search Report April 10, 1989 (10. 04. 89)</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">International Searching Authority Japanese Patent Office</td> <td style="padding: 5px;">Signature of Authorized Officer</td> </tr> </table>			Date of the Actual Completion of the International Search March 24, 1989 (24. 03. 89)	Date of Mailing of this International Search Report April 10, 1989 (10. 04. 89)	International Searching Authority Japanese Patent Office	Signature of Authorized Officer											
Date of the Actual Completion of the International Search March 24, 1989 (24. 03. 89)	Date of Mailing of this International Search Report April 10, 1989 (10. 04. 89)																
International Searching Authority Japanese Patent Office	Signature of Authorized Officer																

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. <sup>4</sup> A 61 K 9 / 1 0		
II. 国際調査を行った分野		
調 査 を 行 っ た 最 小 限 資 料		
分 類 体 系	分 類 記 号	
IPC	A 61 K 9 / 1 0, A 61 K 3 7 / 0 0 - 3 7 / 0 4	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
III. 関連する技術に関する文献		
引用文献の カテゴリー ※	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
Y	JP, B 2, 6 1 - 2 1 4 4 9 ( パテル・メモリアル・インスティテュート ) 27. 5月. 1986 ( 27. 05. 86 ) 特許請求の範囲第 4 項 & DE, A, 2.834.308 & FR, A, 2.399.241 & US, A, 4.229.360	1 - 4
Y	JP, A, 58 - 174330 ( 旭化成工業株式会社 ) 13. 10月. 1983 ( 13. 10. 83 ) 特許請求の範囲 & EP, A, 91258 & FR, A, 2.530.472 & DE, A, 3.373.628 & US, A, 4.447.355	1 - 4
Y	EP, A2, 251001 ( ビオテスト ファルマ ゲゼル シャフト ミット ベシュレンクター ハフツング ) 07. 1月. 1988 ( 07. 01. 88 ) 特許請求の範囲第 1 項	1 - 4
<p>※引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&amp;」 同一パテントファミリーの文献</p>		
IV. 認 証		
国際調査を完了した日 24. 03. 89	国際調査報告の発送日 10.04.89	
国際調査機関 日本国特許庁 (ISA/JP)	権限のある職員 特許庁審査官 河 野 直 樹	4 C 7 4 1 7

第2ページから続く情報

E	<p>(Ⅱ欄の続き)</p> <p>JP, A, 64-9931 (第一製薬株式会社)          13. 1月. 1989 (13. 01. 89)          第1-6頁 (ファミリーなし)</p>	1-4
<p>V. <input type="checkbox"/> 一部の請求の範囲について国際調査を行わないときの意見</p> <p>次の請求の範囲については特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律第8条第3項の規定によりこの国際調査報告を作成しない。その理由は、次のとおりである。</p> <p>1. <input type="checkbox"/> 請求の範囲_____は、国際調査をすることを要しない事項を内容とするものである。</p> <p>2. <input type="checkbox"/> 請求の範囲_____は、有効な国際調査をすることができる程度にまで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 請求の範囲_____は、従属請求の範囲でありかつPCT規則6.4(a)第2文の規定に従って起草されていない。</p>		
<p>VI. <input type="checkbox"/> 発明の単一性の要件を満たしていないときの意見</p> <p>次に述べるようにこの国際出願には二以上の発明が含まれている。</p> <p>1. <input type="checkbox"/> 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されたので、この国際調査報告は、国際出願のすべての調査可能な請求の範囲について作成した。</p> <p>2. <input type="checkbox"/> 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に一部分しか納付されなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付があった発明に係る次の請求の範囲について作成した。          請求の範囲_____</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲に最初に記載された発明に係る次の請求の範囲について作成した。          請求の範囲_____</p> <p>4. <input type="checkbox"/> 追加して納付すべき手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加して納付すべき手数料の納付を命じなかった。</p> <p>追加手数料異議の申立てに関する注意</p> <p><input type="checkbox"/> 追加して納付すべき手数料の納付と同時に、追加手数料異議の申立てがされた。</p> <p><input type="checkbox"/> 追加して納付すべき手数料の納付に際し、追加手数料異議の申立てがされなかった。</p>		